

535,582

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2004 年 6 月 10 日 (10.06.2004)

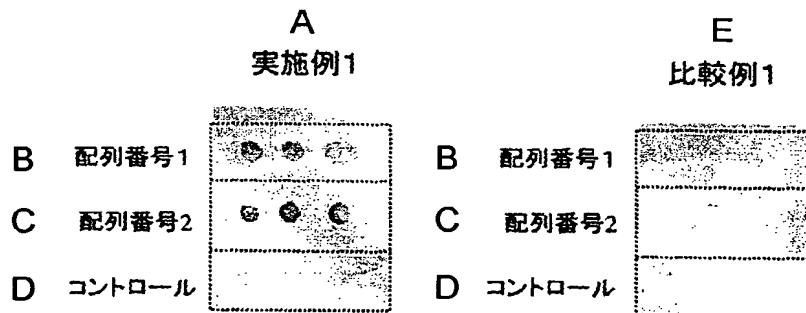
PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/048973 A1

- (51) 国際特許分類: G01N 33/543, 33/553, 37/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/015010
- (22) 国際出願日: 2003 年 11 月 25 日 (25.11.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2002-340464  
2002 年 11 月 25 日 (25.11.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 日清紡績株式会社 (NISSHINBO INDUSTRIES, INC.,) [JP/JP]; 〒103-8650 東京都中央区日本橋人形町 2 丁目 3 1 番 1 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 木村 直紀 (KIMURA, Naoki) [JP/JP]; 〒267-0056 千葉県千葉市
- 緑区大野台 1-2-3 日清紡績株式会社 研究開発センター内 Chiba (JP). 小田 竜一 (ODA, Ryuichi) [JP/JP]; 〒267-0056 千葉県千葉市緑区大野台 1-2-3 日清紡績株式会社 研究開発センター内 Chiba (JP).
- (74) 代理人: 川口 嘉之, 外 (KAWAGUCHI, Yoshiyuki et al.); 〒103-0004 東京都中央区東日本橋 3 丁目 4 番 10 号 アクロポリス 2 1 ビル 6 階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特
- [続葉有]

(54) Title: METHOD OF FIXING BIOMOLECULE ON METAL SUPPORT

(54) 発明の名称: 生体分子の金属担体への固定法



A... EXAMPLE 1  
B... SEQ ID NO:1  
C... SEQ ID NO:2  
D... CONTROL  
E... COMPARATIVE EXAMPLE 1

(57) Abstract: A solution of a nucleic acid is spotted on a metal support comprising a metal selected from among the metals of the groups I, II, III, IV, V, VI and VII in the second to seventh periods in the periodic table and transition metals or an alloy containing such a metal, and dried. Then the support is irradiated with ultraviolet rays containing a component of a wavelength of 280 nm, preferably in a dose of 100 mJ/cm<sup>2</sup> or more, to thereby fix the nucleic acid on the support.

[続葉有]

WO 2004/048973 A1



許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(57) 要約: 核酸の溶液を、周期律表第2周期～第7周期のI、II、III、IV、V、VI、VII族および遷移元素から選ばれる金属、又は同金属を含む合金等からなる金属担体上にスポットし、同溶液を乾燥させ、担体に波長280nmの成分を含む紫外線を好ましくは100mJ/cm<sup>2</sup>以上照射することにより、前記担体に核酸を固定する。

## 明細書

## 生体分子の金属担体への固定法

## 技術分野

本発明は、核酸等の生体分子を担体に固定化する方法に関する。本発明の方法は、ハイブリダイゼーションによる核酸の分析等の操作に有用である。

## 背景技術

従来、ハイブリダイゼーションによる核酸の分析や、イムノアッセイ等においては、核酸やタンパク質を膜や平板などの担体に固定化する技術が利用されている。このような生体分子の固定化法として、核酸では、以下のものが知られている。

(1) 5' 末端にチオール基を有する核酸とチオール基を含むビーズ状基材間のジスルフィド結合による固定 (P. J. R. Day, P. S. Flora, J. E. Fox, M. R. Walker, *Biochem. J.*, 278, 735-740 (1991)) 等のような、修飾基を導入した核酸を化学結合させる方法。

(2) 核酸を、紫外線 (UV) 照射又は加熱処理により、ニトロセルロース、ナイロンメンブレン、又はポリリジン等のカチオンポリマーで被覆されたガラス等の担体等に、吸着固定させる方法 (J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis, *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Pres, Second Edition, pages 2.109-2.113 and pages 9.34-9.46、特表平 10-503841 号公報)。

(3) ポリリジン溶液で処理されたマイクロプレートのウェル中に核酸を注入し、37℃に加熱することにより、物理吸着させることにより固定する方法 (G. C. N. Parry and A. D. B. Malcom, *Biochem. Soc. Trans.*, 17, 230-231 (1989))。

(4) 基材上に結合させたヌクレオチドを用い、基材上で DNA を合成する方法 (国際公開第 97/10365 号パンフレット (W097/10365))。

(5) カルボジイミド基を有する高分子化合物を担持させたガラス等の基材に核酸を固定する方法 (特開平 8-23975 号公報)。

しかし、上記の (1) の方法は、極めて特殊な機械と試薬を必要とする。また、

(2) 及び (3) の方法においては、ハイブリダイゼーションを行った場合、特に操作過程で担体から核酸が剥がれ落ち、結果として検出感度が下がったり、再現性が得られない等の欠点がある。また、この方法では、長い核酸は固定できるが、オリゴマー等約 50 mer 以下の短い核酸になると、効率よく固定化できないという欠点がある。尚、これらの方法では、UV 照射量は数十  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  程度である。さらに、(4) の方法は、基材上で DNA を合成するために、極めて特殊な機械と試薬を必要とし、さらに、合成できる核酸も 25 mer 程度までに限られるという欠点がある。また、(5) の方法は、基材の材料が限られ、表面のコーティング工程が必要である。

#### 発明の開示

本発明は、上記従来技術の状況に鑑み、生体分子、例えば核酸、特に短鎖長の核酸を担体に、簡便、かつ、効率よく固定する方法を提供することを課題とする。

本発明者は、上記課題を解決するために鋭意検討を行った結果、核酸溶液を金属製の担体上にスポットした後に、紫外線を担体に照射することによって、核酸を担体に効率よく固定化することができることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は、以下のとおりである。

(1) 生体分子を担体に固定化する方法であって、生体分子の溶液を担体上にスポットする工程と、前記生体分子溶液をスポットした担体に波長 280 nm の成分を含む紫外線を照射する工程を含み、前記担体は金属製であることを特徴とする方法。

(2) 前記紫外線が、波長 220 ~ 300 nm の成分を含むことを特徴とする (1) に記載の方法。

(3) 前記金属は、周期律表第 2 周期 ~ 第 7 周期の I、II、III、IV、V、VI、VII 族および遷移元素から選ばれる金属、又は同金属を含む合金である (1) 又は (2) に記載の方法。

(4) 前記紫外線の照射量は  $100 \text{ mJ}/\text{cm}^2$  以上である (1) ~ (3) のいずれかに記載の方法。

(5) 前記生体分子は核酸、タンパク質、糖、抗原、抗体、ペプチド、酵素から選ばれる(1)～(4)のいずれかに記載の方法。

(6) 生体分子が担体上に固定化された生体分子固定化担体の製造法であって、生体分子の溶液を担体上にスポットする工程と、前記生体分子溶液をスポットした担体に波長280nmの成分を含む紫外線を照射し、前記生体分子を担体に固定化する工程を含む方法。

(7) 前記紫外線が、波長220～300nmの成分を含むことを特徴とする(6)に記載の方法。

(8) 前記生体分子は核酸であって、核酸固定化担体はハイブリダイゼーションによる核酸の分析に用いられるものである(6)又は(7)に記載の方法。

#### 図面の簡単な説明

図1は、実施例で作製したオリゴヌクレオチド固定化平板を用いたハイブリダイゼーションの結果を示す図(写真)。

点線は、実施例1及び比較例1でオリゴヌクレオチドを固定化した領域、及びコントロールである1×TE緩衝液をスポットした領域を示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明に用いる担体は、生体分子を固定化するためのものであり、金属製であることを特徴とする。金属としては、紫外線照射により生体分子を固定化することができるものであれば特に制限されず、好ましくは、周期律表第2周期～第7周期のI、II、III、IV、V、VI、VII族および遷移元素から選ばれる金属、又は同金属を含む合金が挙げられる。

上記周期律表第2周期～第7周期のI、II、III、IV、V、VI、VII族および遷移元素から選ばれる金属として特に好ましいものとしては、アルミニウム、チタン、白金、タングステン、モリブデン、金、銅、ニッケル等が挙げられる。

また、上記合金として具体的には、洋白(成分:Cu, Ni, Zn)、真鍮(成分:Cu, Zn)、ブロンズ(成分:Cu, Be)、モネル(成分:Cu, Ni, Fe, Mn)、ニッ

ケルコバルト合金（成分：Ni, Co）、ニッケルクロム合金（成分：Ni, Cr）、コバルト合金（成分：Co, Ni, Cr）、ステンレス（成分：Ni, Cr, Fe）、銀タンゲステン（成分：Ag, W）、 $\beta$ チタン（成分：Ti, V, Al）、 $\alpha\beta$ チタン（成分：Ti, V, Al）、NT合金（成分：Ti, Ni）、アルミニウム合金（成分：Al, Cu, Mg, Si, Mn, Zn）、ジュラルミン（成分：Al, Cu, Si, Fe, Mn, Mg, Zn）、マグネシウム合金（成分：Mg, Al, Zn）、K24（成分：Au）、K18（成分：Au, Ag, Cu）、ベリリウム銅（成分：Cu, Be）、鑄鉄（成分：Fe, Mn, S, C）、炭素鋼（成分：Fe, C, Si, Mn, P, S）、青銅鑄物（成分：Cu, Sn, Zn, Pb）、りん青銅鑄物（成分：Cu, Zn, P）、黄銅鑄物（成分：Cu, Zn, Pb）、マンガン黄銅（成分：Cu, Zn, Mn, Fe, Al）、シルジン青銅鑄物（成分：Cu, Si, Zn）、アルミニウム青銅鑄物（成分：Cu, Al, Fe, Ni, Mn）、エリンパー（成分：Ni, Cr, Mn）、エリンパーエクストラ（成分：Ni, Cr, Co, Mn）、インパー（成分：Ni, Fe）、スーパーインパー（成分：Fe, Ni, Co）、ステンレスインパー（成分：Fe, Co, Cr）、Malotties（成分：Sn, Bi, Pb）、リポウィッツ（Lipowitz）（成分：Sn, Bi, Pb, Cd）、ウッズ（Wood's）（成分：Sn, Bi, Pb, Cd）、マンガニン（成分：Cu, Mn, Ni, Fe）、イザベリン（成分：Cu, Mn, Al）、コンスタンタン（成分：Cu, Ni）、アルクレス（成分：Fe, Cr, Al）、カンタル（成分：Cr, Fe, Al, Co）、アルメル（成分：Ni, Al）、磁性材料（Fe, Ni, Co等強磁性遷移元素を含む材料）、パーマロイ（成分：Fe, Ni）、アルパーム（成分：Fe, Al）、フェライト（ $\text{Fe}_2\text{O}_3$ を主成分とする複合酸化物）、センダスト（成分：Fe, Si, Al）、スーパーセンダスト（成分：Fe, Si, Al, Ni,）、アルニコ（成分：Fe, Al, Ni, Co）、水素吸蔵金属（ランタンニッケル合金（成分：La, Ni）等）、Co-Cr系合金、 $\text{SnO}_2$ 系酸化物、Nb-Ti合金、制振合金（振動を低減もしくは吸収、振動の伝播を遮断する合金材料、Al-Zn超塑性合金、サイレントアロイ、ニチノール等）、電極用材料、半導体材料（シリコン、ゲルマニウム、カリウムヒ素等）等が挙げられる。

また、上記金属は、他の金属で蒸着又はメッキ処理（加工）されていても良い。更に、前記金属は、形状を保持するために異なる種類の前記金属が積層してもよく、単一金属であっても良い。

本発明における担体は、本質的に上記金属からなる。担体は、金属のみから構

成されていてもよいし、非金属材料上に金属が接着、蒸着又はメッキ等により積層されていてもよい。

上記担体の形状は、特に問われないが、箔（フォイル）状、平板（プレート）状、薄片（ウェーハ）状、フィルター状、ビーズ状等が挙げられる。また、マイクロタイタープレートのような形状であっても良い。さらに、得られる結果の保存を容易にするため、平板等の裏面をシール等に使用できる材料（接着剤等）を塗布、コート等を行うことによって、シールとしても使用することもできる。

上記担体の所定の位置に、生体分子の溶液をスポットする。生体分子としては、核酸、タンパク質、糖、抗原、抗体、ペプチド、酵素などが挙げられる。以下、生体分子として核酸を例として説明するが、固定の際に紫外線を照射する以外は、他の物質でも通常固定化に用いられている方法や条件を採用することができる。

核酸としては、通常の固相化核酸を用いた核酸同士のハイブリダイゼーションに用いられる固相化核酸と特に変わるところはなく、ハイブリダイゼーションが可能な核酸であれば特に制限されず、例えば、天然又は合成のDNA（オリゴヌクレオチドを含む）もしくはRNA（オリゴヌクレオチドを含む）が挙げられる。また、上記核酸は1本鎖であっても、2本鎖であっても構わない。核酸の鎖長は、ハイブリダイゼーションが可能な長さであれば特に制限されないが、通常5～50000塩基、好ましくは20～10000塩基である。また、核酸の5'末端あるいは3'末端にチミジン等、紫外線によって反応活性基を有するオリゴヌクレオチドの重合体を有しても良い。

核酸を溶解する溶媒も特に制限されず、蒸留水、又は通常核酸溶液の調製に用いられる緩衝液、例えばTE緩衝液（10mM Tris塩酸、pH8.0／1mM EDTA）等のTris緩衝液、食塩を含む水溶液、カルボン酸塩を含む水溶液（クエン酸ナトリウム、クエン酸アンモニウム、酢酸ナトリウム等）、スルホン酸塩を含む水溶液（ドデシル硫酸ナトリウム、ドデシル硫酸アンモニウム等）、ホスホン酸塩を含む水溶液等（リン酸ナトリウム、リン酸アンモニウム等）等を挙げることができる。また、一般に市販されている溶媒、Micro Spotting Solution（TeleChem International, Inc.社製）等も挙げることができる。また、核酸溶液の濃度も特に制限されないが、通常1mmol/ml～1fmol/ml、好ましくは100pmol/ml～100fmol/mlの濃

度である。

核酸溶液を担体上にスポットする方法としては、ピペットで核酸溶液を担体上に滴下する方法、又は市販のスポッタを用いる方法等が挙げられる。スポットの形状及びスポット量としては、核酸溶液をスポットした位置を把握することができる程度であれば、特に制限されないが、形状としては点状又は円状が好ましい。また、好ましいスポット量は10nl～10mlである。核酸溶液は、担体上に1箇所又は複数箇所にスポットされる。スポットされる核酸溶液は、1種類でも2種類又はそれ以上であってもよい。尚、担体に核酸が固定されたことを示す陽性コントロールとして、標識した核酸を固定化しておいてもよい。

本発明の好ましい形態においては、核酸溶液を担体上にスポットした後、280nmの波長を含む紫外線を照射する。前記紫外線としては、波長220～300nmの成分を含む紫外線が挙げられる。また、前記核酸溶液をスポット後紫外線照射前に乾燥させることができる。前記核酸溶液の乾燥方法としては、自然に乾燥させてもよく、加熱して乾燥させてもよい。加熱する場合の温度は、通常30～100℃、好ましくは35～45℃である。

次に、担体、少なくとも担体の核酸を固定した部位に、波長280nmの成分を含む紫外線を照射する。具体的には、波長280nmの単色光でもよいし、波長280nmを含むブロードな波形を有する紫外線であっても良い。波長280nmを含むブロードな波形を有する紫外線としては、例えば波長220～300nmの成分を含む紫外線が挙げられる。また、波長220～300nmの成分を含む紫外線としては、280nm付近に極大値を有する紫外線が挙げられる。照射量は、累積照射量として通常100mJ/cm<sup>2</sup>以上、好ましくは200mJ/cm<sup>2</sup>以上である。

上記のようにして、核酸を担体上に固定化することにより、核酸固定化担体が製造される。本発明の方法により得られる核酸固定化担体は、例えば、ハイブリダイゼーションによる核酸の分析に用いることができる。本発明の方法により担体に固定化された核酸は、通常のハイブリダイゼーションの条件下で担体から脱離しにくいいため、紫外線照射を行わない場合に比べて検出感度が良好で、再現性も良い。ハイブリダイゼーション及びその検出は、通常の固相化核酸を用いたハイブリダイゼーションと同様にして行うことができる。



本発明では、核酸を固定化するのに用いる担体として、安価な金属材料を用いることができるので、低コスト化が可能である。また、金属材料は形成が容易なため、様々な形態のDNAマイクロアレイの作製が容易となる。また、長期保存が可能であり、保存安定性に優れている。さらに、本発明の方法は、担体表面のコーティング工程が不要であり、電極等に使用される金属に直接核酸を固定することができる。電極に核酸を固定することにより溶液中の相補的な核酸と固定された核酸とを効率良くハイブリダイゼーションを行うことができる。核酸は負電化をもっている為、正極に引き寄せられるため、正極の付近は核酸濃度が高くなりやすく、ハイブリダイゼーションが効率よく進むと考えられる。

## 実施例

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。

### 実施例 1 核酸の平板への固定化

常法に従い、オリゴヌクレオチド合成機 (Perkin-elmer Applied biosystems) を用いて、配列番号 1、2 に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチド (21mer) を合成した。また、プローブとして、配列番号 3 に示す塩基配列を有する DNA (262bp) を調製した。尚、配列番号 1 に示すオリゴヌクレオチド及びプローブは、5' 末端をビオチン化した。また、配列番号 2 に示すオリゴヌクレオチドはビオチン化プローブと相補性を持っている。これらのオリゴヌクレオチドを  $1\text{pmol}/\mu\text{l}$  になるように  $1\times\text{TE}$  緩衝液 (10mM Tris 塩酸, pH 8/1mM EDTA) に溶解した。

市販品のアルミニウム箔 (三菱アルミニウム株式会社製) の所定の位置に、上記オリゴヌクレオチド溶液それぞれを、3箇所ずつスポットした (図1)。スポットの量は  $0.5\mu\text{l}$  ずつであり、スポットの大きさは直径約 1mm であった。このアルミニウム箔を乾燥機に入れ、37℃で20分乾燥した。次にUvstratalinker 2400 (STRATAGENE社製) を用い、波長280nmを含む紫外線を16cmの距離から  $250\text{mJ}/\text{cm}^2$  照射した。照射時間は100秒であった。その後、前記アルミニウム箔を水中で30分間振とうして洗浄した後、乾燥させた。

一方、コントロールとして核酸を含まない溶液（1×TE緩衝液）も同様にアルミニウム箔にスポットし、固定化の操作を行った。

#### 比較例 1

予め、アルミニウム箔に、Uvstratalinker 2400（STRATAGENE社製）を用い、波長280nmを含むnmの紫外線を16cmの距離から250mJ/cm<sup>2</sup>照射した。実施例 1 に記載のオリゴヌクレオチド溶液それぞれを、アルミニウム箔の所定の位置に、3箇所ずつスポットした。スポットの量は0.5μlずつであり、スポットの大きさは直径約1mmであった。照射時間は100秒であった。このアルミニウム箔を乾燥機に入れ37℃で20分乾燥した。その後、前記アルミニウム箔を水中で30分間振とうして洗浄し、乾燥させた。

一方、コントロールとして核酸を含まない溶液（1×TE緩衝液）も同様にアルミニウム箔にスポットし、固定化の操作を行った。

#### 実施例 2 ハイブリダイゼーション及びその検出

##### （1）ハイブリダイゼーション

実施例 1 及び比較例 1 のオリゴヌクレオチド固定化アルミニウム箔の核酸を固定化した部分に、3pmolピオチン化プローブ（262bp）を含むハイブリダイゼーション溶液（Arrayit UniHyb（TeleChem International, Inc.）60μlをのせ、アルミニウム箔を水が浸入しないケース（ハイブリカセット）に入れてそのケースごとウォーターバスに沈め、45℃で2時間加熱した。

##### （2）ポストハイブリダイゼーション

上記ハイブリダイゼーションの後、以下の条件でポストハイブリダイゼーション洗浄を行い、オリゴヌクレオチド固定化アルミニウム箔に非特異的に吸着したプローブを除去した。

〔ポストハイブリダイゼーション洗浄の条件〕

- 1) 2×SSC, 0.1%SDS; 室温、5分間、2回
- 2) 0.2×SSC, 0.1%SDS; 40℃、5分間、2回
- 3) 2×SSC; 室温 1分間、3回

### (3) アルミニウム箔に固定化されたオリゴヌクレオチド及びハイブリダイゼーションの検出

アルミニウム箔のハイブリダイゼーション溶液を載せた部分に、乳タンパクを含むブロッキング溶液（ブロックエース 雪印乳業製）1.5mlをのせ、室温で30分間ブロッキングを行った。ブロッキング溶液を除いた後、ストレプトアビジン-アルカリホスファターゼコンジュゲート溶液（VECTOR社製）を1.5mlのせ、室温で30分間反応させた。つぎに、アルミニウム箔をTBST（50mM Tris-HCl（pH7.5），0.15M NaCl，0.05% Tween 20）溶液に浸し、5分間振とうして反応しなかったコンジュゲートを除去した。最後に、アルミニウム箔のハイブリダイゼーション溶液を載せた部分に基質溶液（TMB）を1.5mlのせて、30分間放置し、発色反応を行った。

その結果を、表1に示す。表1中の記号の意味は、表2以下でも同様である。配列番号1のオリゴヌクレオチドを固定化した位置のシグナルは固定化されたオリゴヌクレオチドの量を、配列番号2のオリゴヌクレオチドを固定化した位置のシグナルはハイブリダイゼーションの強度を、それぞれ示す。

表 1

|       | 固定化したオリゴヌクレオチド |        |
|-------|----------------|--------|
|       | 配列番号 1         | 配列番号 2 |
| 実施例 1 | ◎              | ◎      |
| 比較例 1 | ×              | ×      |

◎：大部分のシグナルが非常に高感度かつ非常に明瞭に現れた。

○：大部分のシグナルが高感度かつ明瞭に現れた。

△：一部のシグナルが低感度または不明瞭に現れた。

×：大部分のシグナルが低感度または不明瞭に現れた。またはシグナルが全く現れなかった。

表1の結果から明らかなように、実施例1のオリゴヌクレオチド固定化アルミニウム箔は、比較例1のオリゴヌクレオチド固定化アルミニウム箔に比べて、オ

リボヌクレオチドが確実にアルミニウム箔上に固定化されていることがわかる。また、実施例 1 のオリゴヌクレオチド固定化アルミニウム箔では、ハイブリダイゼーションシグナルも明瞭に現れた。なお、コントロールの位置（核酸を含まない溶液をスポットした箇所）にはシグナルはまったく現れなかった。

### 実施例 3 核酸の平板への固定化

常法に従い、オリゴヌクレオチド合成機（Perkin-elmer Applied biosystems）を用いて、配列番号 4、5 及び 6 に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチド（31mer）を合成した。尚、配列番号 4 に示すオリゴヌクレオチドは、5' 末端をビオチン化した。また、配列番号 4 及び 5 に示すオリゴヌクレオチドは、実施例 1 に記載の配列番号 1 及び 2 に示すオリゴヌクレオチドの 5' 末端に 10 個のチミジンが連結した配列を有している。配列番号 5 のオリゴヌクレオチドは、前記ビオチン化プローブと相補性を持っており、配列番号 6 に示すオリゴヌクレオチドは、配列番号 5 に示すオリゴヌクレオチドと 1 塩基配列が異なるため相補性を持っていない。これらのオリゴヌクレオチドを 100pmol/ml になるように 5×S<sub>SC</sub>に溶解した。

市販品のステンレス製の平板（特殊金属工業株式会社製）の所定の位置に、上記オリゴヌクレオチド溶液それぞれを、スポッター（Pyxis5500 CARTESIAN社製）を用いて 3 箇所ずつスポットした。スポットの大きさは直径約 0.3mm であった。この平板を乾燥機に入れ、42℃で 20 分乾燥した。次に Uvstratalinker 2400（STRATAGENE社製）を用い、波長 280nm を含む紫外線を 16cm の距離から 300mJ/cm<sup>2</sup>照射した。照射時間は 120 秒であった。その後、前記平板を水中で 30 分間振とうして洗浄した後、乾燥させた。

一方、コントロールとして核酸を含まない溶液（2xSSC緩衝液）も同様に平板にスポットし、固定化の操作を行った。

### 比較例 2

予め、ステンレス製の平板に、Uvstratalinker 2400（STRATAGENE社製）を用い、波長 280nm を含む紫外線を 16cm の距離から 300mJ/cm<sup>2</sup>照射した。実施例 3 に記

載のオリゴヌクレオチド溶液それぞれを、ステンレス製の平板の所定の位置に、スポットター (Pyxis5500 CARTESIAN社製) を用いて3箇所ずつスポットした。照射時間は120秒であった。この平板を乾燥機に入れ42℃で20分乾燥した。その後、前記平板を水中で30分間振とうして洗浄し、乾燥させた。

一方、コントロールとして核酸を含まない溶液 (2xSSC緩衝液) も同様に平板にスポットし、固定化の操作を行った。

#### 実施例4 ハイブリダイゼーション及びその検出

実施例3及び比較例2のオリゴヌクレオチド固定化平板の核酸を固定化した部分に、3pmolビオチン化プローブ (262bp) を含むハイブリダイゼーション溶液 (Arrayit UniHyb (TeleChem International, Inc.) 60mlをのせ、平板を水が浸入しないケース (ハイブリカセット) に入れてそのケースごとウォーターバスに沈め、45℃で2時間加熱した。

以下、実施例2と同様にしてポストハイブリダイゼーション、及び平板に固定化されたオリゴヌクレオチドならびにハイブリダイゼーションの検出を行った。その結果を、表2に示す。配列番号4のオリゴヌクレオチドを固定化した位置のシグナルは固定化されたオリゴヌクレオチドの量を、配列番号5のオリゴヌクレオチドを固定化した位置のシグナルはハイブリダイゼーションの強度を、それぞれ示す。

表2

|      | 固定化したオリゴヌクレオチド |       |       |
|------|----------------|-------|-------|
|      | 配列番号4          | 配列番号5 | 配列番号6 |
| 実施例3 | ◎              | ◎     | ×     |
| 比較例2 | ×              | ×     | ×     |

表2の結果から明らかなように、実施例3のオリゴヌクレオチド固定化平板は、

比較例 2 のオリゴヌクレオチド固定化平板に比べて、オリゴヌクレオチドが確実に平板上に固定化されていることがわかる。また、実施例 3 のオリゴヌクレオチド固定化平板では、ハイブリダイゼーションシグナルも明瞭に現れた。ここで、コントロールの位置（核酸を含まない溶液をスポットした箇所）及び配列番号 6 にはシグナルはまったく現れなかった。

#### 実施例 5 核酸の平板への固定化

銀タングステン製の平板（イースタン技研株式会社製）の所定の位置に、実施例 3 で調製したオリゴヌクレオチド溶液それぞれを、スポットターを用いて 3 箇所ずつスポットした。スポットの大きさは直径約 0.3mm であった。この平板を乾燥機に入れ、42℃で 20 分乾燥した。次に Uvstratalinker 2400（STRATAGENE 社製）を用い、波長 280nm を含む紫外線を 16cm の距離から 400mJ/cm<sup>2</sup> 照射した。照射時間は 160 秒であった。その後、前記平板を水中で 30 分間振とうして洗浄した後、乾燥させた。

一方、コントロールとして核酸を含まない溶液（2xSSC 緩衝液）も同様に平板にスポットし、固定化の操作を行った。

#### 比較例 3

予め、銀タングステン製の平板に、Uvstratalinker 2400（STRATAGENE 社製）を用い、波長 280nm を含む紫外線を 16cm の距離から 400mJ/cm<sup>2</sup> 照射した。実施例 3 に記載のオリゴヌクレオチド溶液それぞれを、銀タングステン製の平板の所定の位置に、スポットター（Pyxis 5500 CARTESIAN 社製）を用いて 3 箇所ずつスポットした。照射時間は 160 秒であった。この平板を乾燥機に入れ 42℃で 20 分乾燥した。その後、前記平板を水中で 30 分間振とうして洗浄し、乾燥させた。

一方、コントロールとして核酸を含まない溶液（2xSSC 緩衝液）も同様に平板にスポットし、固定化の操作を行った。

#### 実施例 6 ハイブリダイゼーション及びその検出

実施例 5 及び比較例 3 のオリゴヌクレオチド固定化平板の核酸を固定化した部

分に、3pmolピオチン化プローブ（262bp）を含むハイブリダイゼーション溶液（Arrayit UniHyb（TeleChem International, Inc.）60mlをのせ、平板を水が浸入しないケース（ハイブリカセット）に入れてそのケースごとウォーターバスに沈め、45℃で2時間加熱した。

以下、実施例2と同様にしてポストハイブリダイゼーション、及び平板に固定化されたオリゴヌクレオチドならびにハイブリダイゼーションの検出を行った。その結果を、表3に示す。

表 3

|       | 固定化したオリゴヌクレオチド |        |        |
|-------|----------------|--------|--------|
|       | 配列番号 4         | 配列番号 5 | 配列番号 6 |
| 実施例 5 | ◎              | ◎      | ×      |
| 比較例 3 | ×              | ×      | ×      |

表3の結果から明らかなように、実施例5のオリゴヌクレオチド固定化平板は、比較例3のオリゴヌクレオチド固定化平板に比べて、オリゴヌクレオチドが確実に平板上に固定化されていることがわかる。また、実施例5のオリゴヌクレオチド固定化平板では、ハイブリダイゼーションシグナルも明瞭に現れた。ここで、コントロールの位置（核酸を含まない溶液をスポットした箇所）及び配列番号6にはシグナルはまったく現れなかった。

#### 実施例7 核酸の平板への固定化

常法に従い、配列番号7及び8に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして、λ DNA断片（A）を増幅した。得られた断片をアガロース電気泳動し、エチジウムブロマイド染色により検出した結果、その断片の長さは約300bであった。また、前記λ DNAと相補的でないλ DNA断片（B）（約300b）も同様に増幅した。

市販品のアルミニウム箔（三菱アルミニウム株式会社製）の所定の位置に、上記λ DNA溶液それぞれを、スポットター（Pyxis5500 CARTESIAN社製）を用いて3箇所ずつスポットした。スポットの大きさは直径約0.3mmであった。このアルミニウム箔を乾燥機に入れ、42℃で20分乾燥した。次にUvstratalinker 2400（STRATAGENE社製）を用い、波長280nmを含む紫外線を16cmの距離から600mJ/cm<sup>2</sup>照射した。照射時間は240秒であった。その後、前記アルミニウム箔を水中で30分間振とうして洗浄した後、乾燥させた。

一方、コントロールとして核酸を含まない溶液（1×TE緩衝液）も同様にアルミニウム箔にスポットし、固定化の操作を行った。

#### 比較例 4

実施例 7 に記載のλ DNA溶液（濃度1pmol/μl）それぞれを、アルミニウム箔の所定の位置に、スポットター（Pyxis5500 CARTESIAN社製）を用いて3箇所ずつスポットした。このアルミニウム箔を乾燥機に入れ42℃で20分乾燥した。その後、前記アルミニウム箔を水中で30分間振とうして洗浄し、乾燥させた。

一方、コントロールとして核酸を含まない溶液（1×TE緩衝液）も同様にアルミニウム箔にスポットし、固定化の操作を行った。

#### 実施例 8 ハイブリダイゼーション及びその検出

##### （1）ハイブリダイゼーション

配列番号 7 に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドの 5' 末端にビオチンを標識したオリゴヌクレオチド及び配列番号 8 に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして、λ DNA断片（C）を増幅した。このλ DNA断片（C）の配列は、実施例 7 で作製したλ DNA断片（A）の配列と同一である。

実施例 7 及び比較例 4 のλ DNA固定化アルミニウム箔を95℃に暖めた水中に5分間浸し、4℃に冷やした水中に5分間浸した。次いで、λ DNA固定化アルミニウム箔の核酸を固定化した部分に、前記0.5pmolビオチン化λ DNA（C）を含むハイブリダイゼーション溶液（Arrayit UniHyb（TeleChem International, Inc.）60mlをのせ、アルミニウム箔を水が浸入しないケース（ハイブリカセット）



に入れてそのケースごとウォーターバスに沈め、55℃で2時間加熱した。

## (2) ポストハイブリダイゼーション

上記ハイブリダイゼーションの後、以下の条件でポストハイブリダイゼーション洗浄を行い、 $\lambda$  DNA固定化アルミニウム箔に非特異的に吸着したプローブを除去した。

〔ポストハイブリダイゼーション洗浄の条件〕

- 1) 2×SSC, 0.1%SDS; 室温、5分間、2回
- 2) 0.2×SSC, 0.1%SDS; 40℃、5分間、2回
- 3) 2×SSC; 室温1分間、3回

## (3) ハイブリダイゼーションの検出

アルミニウム箔のハイブリダイゼーション溶液を載せた部分に、乳タンパクを含むブロッキング溶液（ブロックエース 雪印乳業製）1.5mlをのせ、室温で30分間ブロッキングを行った。ブロッキング溶液を除いた後、ストレプトアビジン-アルカリホスファターゼコンジュゲート溶液（VECTOR社製）を1.5mlのせ、室温で30分間反応させた。つぎに、アルミニウム箔をTBST（50mM Tris-HCl（pH7.5），0.15M NaCl, 0.05% Tween 20）溶液に浸し、5分間振とうして反応しなかったコンジュゲートを除去した。最後に、アルミニウム箔（はく）のハイブリダイゼーション溶液を載せた部分に基質溶液（TMB）を1.5mlのせて、30分間放置し、発色反応を行った。

その結果を表4に示す。

表 4

|       | 固定化した核酸             |                     |
|-------|---------------------|---------------------|
|       | $\lambda$ DNA断片 (A) | $\lambda$ DNA断片 (B) |
| 実施例 7 | ◎                   | ×                   |
| 比較例 4 | ×                   | ×                   |

表4の結果から明らかなように、ハイブリダイゼーションシグナルが特異的かつ明瞭に現れたことから、実施例7の $\lambda$  DNA断片固定化アルミニウムはくは $\lambda$  DNA断片が確実にアルミニウムはく上に固定化されていることがわかる。一方、比較例4の $\lambda$  DNA断片固定化アルミニウムはくには、シグナルはまったく現れなかった。さらに、実施例7の $\lambda$  DNA断片固定化アルミニウムはく及び比較例4の $\lambda$  DNA断片固定化アルミニウムはくのコントロールの位置（核酸を含まない溶液をスポットした箇所）にもシグナルはまったく現れなかった。

#### 実施例9 核酸の平板への固定化

市販品のステンレス製の平板（特殊金属工業株式会社製）の所定の位置に、実施例7に記載の $\lambda$  DNA溶液それぞれを、スポッター（Pyxis5500 CARTESIAN社製）を用いて3箇所ずつスポットした。スポットの大きさは直径約0.3mmであった。この平板を乾燥機に入れ、42℃で20分乾燥した。次にUvstratalinker 2400（STRATAGENE社製）を用い、波長280nmを含む紫外線を16cmの距離から1200mJ/cm<sup>2</sup>照射した。照射時間は480秒であった。その後、前記平板を水中で30分間振とうして洗浄した後、乾燥させた。

一方、コントロールとして核酸を含まない溶液（1×TE緩衝液）も同様に平板にスポットし、固定化の操作を行った。

#### 比較例5

実施例7記載の $\lambda$  DNA溶液（濃度1pmol/ $\mu$ l）それぞれを、ステンレス製の平板の所定の位置に、スポッター（Pyxis5500 CARTESIAN社製）を用いて3箇所ずつスポットした。この平板を乾燥機に入れ42℃で20分乾燥した。その後、前記平板を水中で30分間振とうして洗浄し、乾燥させた。

一方、コントロールとして核酸を含まない溶液（1×TE緩衝液）も同様に平板にスポットし、固定化の操作を行った。

#### 実施例10 ハイブリダイゼーション及びその検出

実施例 9 及び比較例 5 の  $\lambda$  DNA 固定化平板を 95℃ に暖めた水中に 10 分間浸し、4℃ に冷やした水中に 5 分間浸した。次いで、 $\lambda$  DNA 固定化平板の核酸を固定化した部分に、実施例 8 に記載の 1pmol ビオチン化  $\lambda$  DNA (C) を含むハイブリダイゼーション溶液 (Arrayit UniHyb (TeleChem International, Inc.) 60ml) をのせ、平板を水が浸入しないケース (ハイブリカセット) に入れてそのケースごとウォーターバスに沈め、60℃ で 2 時間加熱した。

以下、実施例 8 と同様にしてポストハイブリダイゼーション及びハイブリダイゼーションの検出を行った。その結果を表 5 に示す。

表 5

|       | 固定化した核酸              |                      |
|-------|----------------------|----------------------|
|       | $\lambda$ DNA 断片 (A) | $\lambda$ DNA 断片 (B) |
| 実施例 9 | ◎                    | ×                    |
| 比較例 5 | ×                    | ×                    |

表 5 の結果から明らかなように、ハイブリダイゼーションシグナルが特異的かつ明瞭に現れたことから、実施例 9 の  $\lambda$  DNA 断片固定化平板は  $\lambda$  DNA 断片が確実に平板上に固定化されていることがわかる。一方、比較例 5 の  $\lambda$  DNA 断片固定化平板には、シグナルはまったく現れなかった。さらに、実施例 9 の  $\lambda$  DNA 断片固定化平板及び比較例 5 の  $\lambda$  DNA 断片固定化平板のコントロールの位置 (核酸を含まない溶液をスポットした箇所) にもシグナルはまったく現れなかった。

#### 実施例 11 核酸の平板への固定化

市販品のシリコンウェーハ (三菱住友シリコン株式会社製) の所定の位置に、実施例 7 に記載の  $\lambda$  DNA 溶液それぞれを、スポッター (Pyxis5500 CARTESIAN 社製) を用いて 3 箇所ずつスポットした。スポットの大きさは直径約 0.3mm であった。このシリコンウェーハを乾燥機に入れ、42℃ で 20 分乾燥した。次に Uvst

ratalinker 2400 (STRATAGENE社製) を用い、波長280nmを含む紫外線を16cmの距離から1200mJ/cm<sup>2</sup>照射した。照射時間は480秒であった。その後、前記シリコンウェーハを水中で30分間振とうして洗浄した後、乾燥させた。

一方、コントロールとして核酸を含まない溶液(1×TE緩衝液)も同様にシリコンウェーハにスポットし、固定化の操作を行った。

#### 比較例 6

実施例7記載のλDNA溶液(濃度1pmol/μl)それぞれを、シリコンウェーハの所定の位置に、スポットター(Pyxis5500 CARTESIAN社製)を用いて3箇所づつスポットした。この平板を乾燥機に入れ42℃で20分乾燥した。その後、前記シリコンウェーハを水中で30分間振とうして洗浄し、乾燥させた。

#### 実施例 1 2 ハイブリダイゼーション及びその検出

実施例11及び比較例6のλDNA固定化シリコンウェーハを95℃に暖めた水中に10分間浸し、4℃に冷やした水中に5分間浸した。次いで、λDNA固定化シリコンウェーハの核酸を固定化した部分に、実施例8に記載の1pmolビオチン化λDNA(C)を含むハイブリダイゼーション溶液(Arrayit UniHyb (TeleChem International, Inc.)) 60mlをのせ、シリコンウェーハを水が浸入しないケース(ハイブリカセット)に入れてそのケースごとウォーターバスに沈め、60℃で2時間加熱した。

以下、実施例8と同様にしてポストハイブリダイゼーション及びハイブリダイゼーションの検出を行った。その結果を表6に示す。

表 6

|         | 固定化した核酸     |             |
|---------|-------------|-------------|
|         | λ DNA断片 (A) | λ DNA断片 (B) |
| 実施例 1 1 | ◎           | ×           |
| 比較例 6   | ×           | ×           |

表 6 の結果から明らかなように、ハイブリダイゼーションシグナルが特異的かつ明瞭に現れたことから、実施例 1 1 の  $\lambda$  DNA 断片固定化シリコンウェーハは  $\lambda$  DNA 断片が確実にシリコンウェーハ上に固定化されていることがわかる。一方、比較例 6 の  $\lambda$  DNA 断片固定化シリコンウェーハには、シグナルはまったく現れなかった。さらに、実施例 1 1 の  $\lambda$  DNA 断片固定化シリコンウェーハ及び比較例 6 の  $\lambda$  DNA 断片固定化シリコンウェーハのコントロールの位置（核酸を含まない溶液をスポットした箇所）にもシグナルはまったく現れなかった。

### 実施例 1 3 核酸の平板への固定化

ガラス板に金蒸着させた基板の所定の位置に、実施例 7 に記載の  $\lambda$  DNA 溶液それぞれを、スポットター（Pyxis5500 CARTESIAN社製）を用いて 3 箇所ずつスポットした。スポットの大きさは直径約 0.3mm であった。この金蒸着ガラス基板を乾燥機に入れ、42℃で 20 分乾燥した。次に Uvstratalinker 2400（STRATAGEN E社製）を用い、波長 280nm を含む紫外線を 16cm の距離から 1200mJ/cm<sup>2</sup> 照射した。照射時間は 480 秒であった。その後、前記金蒸着ガラス基板を水中で 30 分間振とうして洗浄した後、乾燥させた。

一方、コントロールとして核酸を含まない溶液（1×TE 緩衝液）も同様に金蒸着ガラス基板にスポットし、固定化の操作を行った。

### 比較例 7

実施例 7 に記載の  $\lambda$  DNA 溶液（濃度 1pmol/ $\mu$ l）それぞれを、金蒸着ガラス基板の所定の位置に、スポットター（Pyxis5500 CARTESIAN社製）を用いて 3 箇所ずつスポットした。この平板を乾燥機に入れ 42℃で 20 分乾燥した。その後、前記金蒸着ガラス基板を水中で 30 分間振とうして洗浄し、乾燥させた。

### 実施例 1 4 ハイブリダイゼーション及びその検出

実施例 1 3 及び比較例 7 の  $\lambda$  DNA 固定化金蒸着ガラス基板を 95℃に暖めた水中に 10 分間浸し、4℃に冷やした水中に 5 分間浸した。次いで、 $\lambda$  DNA 固定化

金蒸着ガラス基板の核酸を固定化した部分に、実施例 8 に記載の 1pmol ビオチン化  $\lambda$  DNA (C) を含むハイブリダイゼーション溶液 (Arrayit UniHyb (TeleChem International, Inc.) 60ml をのせ、金蒸着ガラス基板を水が浸入しないケース (ハイブリカセット) に入れてそのケースごとウォーターバスに沈め、60℃で 2 時間加熱した。

以下、実施例 8 と同様にしてポストハイブリダイゼーション及びハイブリダイゼーションの検出を行った。その結果を表 7 に示す。

表 7

|         | 固定化した核酸             |                     |
|---------|---------------------|---------------------|
|         | $\lambda$ DNA断片 (A) | $\lambda$ DNA断片 (B) |
| 実施例 1 3 | ◎                   | ×                   |
| 比較例 7   | ×                   | ×                   |

表 7 の結果から明らかなように、ハイブリダイゼーションシグナルが特異的かつ明瞭に現れたことから、実施例 1 3 の  $\lambda$  DNA断片固定化金蒸着ガラス基板は  $\lambda$  DNA断片が確実に金蒸着ガラス基板上に固定化されていることがわかる。一方、比較例 7 の  $\lambda$  DNA断片固定化金蒸着ガラス基板には、シグナルはまったく現れなかった。さらに、実施例 1 3 の  $\lambda$  DNA断片固定化金蒸着ガラス基板及び比較例 7 の  $\lambda$  DNA断片固定化金蒸着ガラス基板のコントロールの位置 (核酸を含まない溶液をスポットした箇所) にもシグナルはまったく現れなかった。

#### 実施例 1 5 核酸の平板への固定化

市販の銅箔 (日鉱金属加工株式会社製) の所定の位置に、実施例 7 に記載の  $\lambda$  DNA溶液それぞれを、スポッター (Pyxis5500 CARTESIAN社製) を用いて 3 箇所づつスポットした。スポットの大きさは直径約 0.3mm であった。この銅箔を乾燥機に入れ、42℃で 20 分乾燥した。次に Uvstratalinker 2400 (STRATAGENE社製) を用い、波長 254nm を含む紫外線を 16cm の距離から 1200mJ/cm<sup>2</sup> 照射した。

照射時間は480秒であった。その後、前記銅箔を水中で30分間振とうして洗浄した後、乾燥させた。

一方、コントロールとして核酸を含まない溶液（1×TE緩衝液）も同様に銅箔にスポットし、固定化の操作を行った。

#### 比較例 8

実施例 7 記載の  $\lambda$  DNA 溶液（濃度  $1\text{pmol}/\mu\text{l}$ ）それぞれを、銅箔の所定の位置に、スポットター（Pyxis5500 CARTESIAN社製）を用いて3箇所づつスポットした。この銅箔を乾燥機に入れ  $42^{\circ}\text{C}$  で20分乾燥した。その後、前記銅箔を水中で30分間振とうして洗浄し、乾燥させた。

#### 実施例 16 ハイブリダイゼーション及びその検出

実施例 15 及び比較例 8 の  $\lambda$  DNA 固定化銅箔を  $95^{\circ}\text{C}$  に暖めた水中に10分間浸し、 $4^{\circ}\text{C}$  に冷やした水中に5分間浸した。次いで、 $\lambda$  DNA 固定化銅箔の核酸を固定化した部分に、実施例 8 に記載の  $1\text{pmol}$  ビオチン化  $\lambda$  DNA (C) を含むハイブリダイゼーション溶液（Arrayit UniHyb (TeleChem International, Inc.) 60ml をのせ、銅箔を水が浸入しないケース（ハイブリカセット）に入れてそのケースごとウォーターバスに沈め、 $60^{\circ}\text{C}$  で2時間加熱した。

以下、実施例 8 と同様にしてポストハイブリダイゼーション及びハイブリダイゼーションの検出を行った。その結果を表 8 に示す。

表 8

|        | 固定化した核酸             |                     |
|--------|---------------------|---------------------|
|        | $\lambda$ DNA断片 (A) | $\lambda$ DNA断片 (B) |
| 実施例 15 | ◎                   | ×                   |
| 比較例 8  | ×                   | ×                   |

表 8 の結果から明らかなように、ハイブリダイゼーションシグナルが特異的か

つ明瞭に現れたことから、実施例 15 の  $\lambda$  DNA 断片固定化銅箔は  $\lambda$  DNA 断片が確実に銅箔上に固定化されていることがわかる。一方、比較例 8 の  $\lambda$  DNA 断片固定化銅箔には、シグナルはまったく現れなかった。さらに、実施例 15 の  $\lambda$  DNA 断片固定化金蒸着ガラス基板及び比較例 8 の  $\lambda$  DNA 断片固定化銅箔のコントロールの位置（核酸を含まない溶液をスポットした箇所）にもシグナルはまったく現れなかった。

#### 実施例 17 核酸の平板への固定化

市販の純ニッケル箔（日鉱金属加工株式会社製）の所定の位置に、実施例 7 に記載の  $\lambda$  DNA 溶液それぞれを、スポットター（Pyxis5500 CARTESIAN社製）を用いて 3 箇所ずつスポットした。スポットの大きさは直径約 0.3mm であった。この純ニッケル箔を乾燥機に入れ、42℃ で 20 分乾燥した。次に Uvstratalinker 2400（STRATAGENE社製）を用い、波長 280nm を含む紫外線を 16cm の距離から 1200mJ/cm<sup>2</sup> 照射した。照射時間は 480 秒であった。その後、前記純ニッケル箔を水中で 30 分間振とうして洗浄した後、乾燥させた。

一方、コントロールとして核酸を含まない溶液（1×TE 緩衝液）も同様に純ニッケル箔にスポットし、固定化の操作を行った。

#### 比較例 9

実施例 7 記載の  $\lambda$  DNA 溶液（濃度 1pmol/ $\mu$ l）それぞれを、純ニッケル箔の所定の位置に、スポットター（Pyxis5500 CARTESIAN社製）を用いて 3 箇所ずつスポットした。この純ニッケル箔を乾燥機に入れ 42℃ で 20 分乾燥した。その後、前記純ニッケル箔を水中で 30 分間振とうして洗浄し、乾燥させた。

#### 実施例 18 ハイブリダイゼーション及びその検出

実施例 17 及び比較例 9 の  $\lambda$  DNA 固定化純ニッケル箔を 95℃ に暖めた水中に 10 分間浸し、4℃ に冷やした水中に 5 分間浸した。次いで、 $\lambda$  DNA 固定化純ニッケル箔の核酸を固定化した部分に、実施例 8 に記載の 1pmol ピオチン化  $\lambda$  DNA (C) を含むハイブリダイゼーション溶液（Arrayit UniHyb (TeleChem Internat



ional, Inc.) 60mlをのせ、純ニッケル箔を水が浸入しないケース（ハイブリカセット）に入れてそのケースごとウォーターバスに沈め、60℃で2時間加熱した。

以下、実施例8と同様にしてポストハイブリダイゼーション及びハイブリダイゼーションの検出を行った。その結果を表9に示す。

表9

| 固定化した核酸 |             |             |
|---------|-------------|-------------|
|         | λ DNA断片 (A) | λ DNA断片 (B) |
| 実施例 1 7 | ◎           | ×           |
| 比較例 9   | ×           | ×           |

表9の結果から明らかなように、ハイブリダイゼーションシグナルが特異的かつ明瞭に現れたことから、実施例17のλ DNA断片固定化銅箔はλ DNA断片が確実に純ニッケル箔上に固定化されていることがわかる。一方、比較例9のλ DNA断片固定化純ニッケル箔には、シグナルはまったく現れなかった。さらに、実施例17のλ DNA断片固定化純ニッケル箔及び比較例9のλ DNA断片固定化純ニッケル箔のコントロールの位置（核酸を含まない溶液をスポットした箇所）にもシグナルはまったく現れなかった。

#### 実施例 1 9

常法に従い、オリゴヌクレオチド合成機（Perkin-elmer Applied biosystems）を用いて、配列番号9、10及び11に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチド（26mer）を合成した。尚、配列番号9に示すオリゴヌクレオチドは、5'末端をビオチン化した。また、配列番号9及び10に示すオリゴヌクレオチドは、実施例1に記載の配列番号1及び2に示すオリゴヌクレオチドの5'末端に5個のチミジンが連結した配列を有している。配列番号11に示すオリゴヌクレオチドは、配列番号5に示すオリゴヌクレオチドと1塩基配列が異なるため相補性を持っていない。すなわち、これらのオリゴヌクレオチドは、実施例3の配

列番号 4、5 及び 6 のオリゴヌクレオチドの 5' 末端のチミジンを 5 個に減らしたものである。

上記オリゴヌクレオチドを、実施例 3 と同様にして市販品のステンレス製の平板（特殊金属工業株式会社製）に固定化した。以下、実施例 2 と同様にしてポストハイブリダイゼーション、及び平板に固定化されたオリゴヌクレオチドならびにハイブリダイゼーションの検出を行った。

#### 比較例 10

実施例 19 に記載のオリゴヌクレオチド溶液を用いた他は、比較例 2 と同様にして、ステンレス製の平板に各々のオリゴヌクレオチドを固定化した。

#### 実施例 20

実施例 19 及び比較例 10 のオリゴヌクレオチド固定化平板の核酸を固定化した部分に、3pmol ビオチン化プローブ（262bp）を含むハイブリダイゼーション溶液（Arrayit UniHyb (TeleChem International, Inc.) 60ml をのせ、平板を水が浸入しないケース（ハイブリカセット）に入れてそのケースごとウォーターバスに沈め、45℃で 2 時間加熱した。

以下、実施例 2 と同様にしてポストハイブリダイゼーション、及び平板に固定化されたオリゴヌクレオチドならびにハイブリダイゼーションの検出を行った。その結果を、表 10 に示す。配列番号 9 のオリゴヌクレオチドを固定化した位置のシグナルは固定化されたオリゴヌクレオチドの量を、配列番号 10 のオリゴヌクレオチドを固定化した位置のシグナルはハイブリダイゼーションの強度を、それぞれ示す。

表 1 0

| 固定化したオリゴヌクレオチド |        |          |          |
|----------------|--------|----------|----------|
|                | 配列番号 9 | 配列番号 1 0 | 配列番号 1 1 |
| 実施例 1 9        | ◎      | ◎        | ×        |
| 比較例 1 0        | ×      | ×        | ×        |

#### 産業上の利用の可能性

本発明の方法により、生体分子、例えば核酸、特に鎖長の短い核酸を、金属製担体に簡便、かつ、効率よく固定することができる。また、担体表面のコーティングが不要であるため、金属製の電極等に直接生体分子を固定化することができる。

## 請求の範囲

1. 生体分子を担体に固定化する方法であって、生体分子の溶液を担体上にスポットする工程と、前記生体分子溶液をスポットした担体に波長280nmの成分を含む紫外線を照射する工程を含み、前記担体は金属であることを特徴とする方法。

2. 前記紫外線が、波長220～300nmの成分を含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

3. 前記金属は、周期律表第2周期～第7周期のI、II、III、IV、V、VI、VII族および遷移元素から選ばれる金属、又は同金属を含む合金である請求項1又は2に記載の方法。

4. 前記紫外線の照射量は100mJ/cm<sup>2</sup>以上である請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

5. 前記生体分子は核酸、タンパク質、糖、抗原、抗体、ペプチド、酵素から選ばれる請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

6. 生体分子が担体上に固定化された生体分子固定化担体の製造法であって、生体分子の溶液を担体上にスポットする工程と、前記生体分子溶液をスポットした担体に波長280nmの成分を含む紫外線を照射し、前記生体分子を担体に固定化する工程を含む方法。

7. 前記紫外線が、波長220～300nmの成分を含むことを特徴とする請求項6に記載の方法。

8. 前記生体分子は核酸であって、核酸固定化担体はハイブリダイゼーションによる核酸の分析に用いられるものである請求項6に記載の方法。

1/1

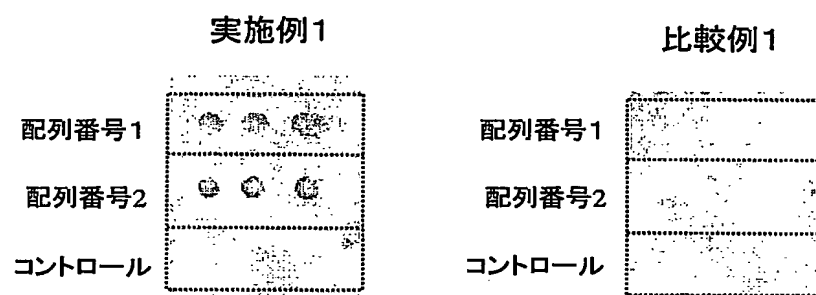


Fig. 1

## SEQUENCE LISTING

<110> Nisshinbo Industries, Inc.

<120> Method for immobilizing biomolecules on metallic substrate

<130> F22240P1657

<150> JP 2002-340464

<151> 2002-11-25

<160> 11

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: capture  
oligonucleotide

<400> 1

aaatgggtac tgtgcctgtt a

21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: capture  
oligonucleotide

<400> 2

atgactaccg gcgcgacgat g

21

<210> 3  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: probe DNA

<400> 3

```
tcgcccgcctg tttttgatga ggcggatttt ccggcagttg ccgtttatct caccggcgct 60
gaatacacgg gcgaagagct ggacagcgat acctggcagg cggagctgca tatcgaagtt 120
ttcctgcctg ctcaggtagc ggattcagag ctggatgcgt ggatggagtc ccggatttat 180
ccggtgatga gcgatatccc ggcactgta gatttgatca ccagtatggt ggccagcggc 240
tatgactacc ggcgcgacga tg                                     262
```

<210> 4  
<211> 31  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: capture  
oligonucleotide

<400> 4

```
ttttttttt aaatgggtac tgtgcctgtt a
```

31

<210> 5  
<211> 31  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: capture  
oligonucleotide

<400> 5

tttttttttt atgactaccg gcgcgacgat g

31

<210> 6

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: capture  
oligonucleotide

<400> 6

tttttttttt atgactacca gcgcgacgat g

31

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: capture  
oligonucleotide

<400> 7

tcgccccgct gtttttgatg a

21

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: capture  
oligonucleotide

<400> 8

catcgtcgcg ccggtagtca t

21



<210> 9

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: capture  
oligonucleotide

<400> 9

tttttaaag ggtactgtgc ctgtta

26

<210> 10

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: capture  
oligonucleotide

<400> 10

tttttatgac taccggcgcg acgatg

26

<210> 11

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: capture  
oligonucleotide

<400> 11

tttttatgac taccagcgcg acgatg

26

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/15010

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> G01N33/543, G01N33/553, G01N37/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> G01N33/543, G01N33/553, G01N37/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

|                           |           |                            |           |
|---------------------------|-----------|----------------------------|-----------|
| Jitsuyo Shinan Koho       | 1922-1996 | Toroku Jitsuyo Shinan Koho | 1994-2003 |
| Kokai Jitsuyo Shinan Koho | 1971-2003 | Jitsuyo Shinan Toroku Koho | 1996-2003 |

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                    | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| X         | JP 2001-281246 A (Nisshinbo Industries, Inc.),<br>10 October, 2001 (10.10.01),<br>& EP 1130121 A & US 2002-0018996 A1 | 1-7                   |
| X         | JP 2002-250726 A (Toray Industries, Inc.),<br>06 September, 2002 (06.09.02),<br>(Family: none)                        | 1-7                   |
| A         | JP 2001-136968 A (Mitsubishi Rayon Co., Ltd.),<br>22 May, 2001 (22.05.01),<br>(Family: none)                          | 1-7                   |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
23 February, 2004 (23.02.04)Date of mailing of the international search report  
16 March, 2004 (16.03.04)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> G01N33/543, G01N33/553, G01N37/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> G01N33/543, G01N33/553, G01N37/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年  
 日本国公開実用新案公報 1971-2003年  
 日本国登録実用新案公報 1994-2003年  
 日本国実用新案登録公報 1996-2003年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示  | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| X               | JP 2001-281246 A (日清紡績株式会社) 200<br>1. 10. 10<br>& EP 1130121 A<br>& US 2002-0018996 A1 | 1-7              |
| X               | JP 2002-250726 A (東レ株式会社) 2002. 0<br>9. 06<br>(ファミリーなし)                                | 1-7              |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

23. 02. 04

国際調査報告の発送日

16. 3. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JPO)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

竹中 靖典

2J

9507

電話番号 03-3581-1101 内線 3251

| C (続き) . 関連すると認められる文献 |   |                  |
|-----------------------|---|------------------|
| 引用文献の<br>カテゴリー*       | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                         | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
| A                     | JP 2001-136968 A (三菱レイヨン株式会社) 20<br>01.05.22<br>(ファミリーなし) | 1-7              |

訂正版

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2004 年 6 月 10 日 (10.06.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/048973 A1

(51) 国際特許分類: G01N 33/543, 33/553, 37/00

〒103-8650 東京都中央区日本橋人形町2丁目3番1号 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/015010

(22) 国際出願日: 2003 年 11 月 25 日 (25.11.2003)

(72) 発明者; および

(25) 国際出願の言語: 日本語

(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 木村 直紀 (KIMURA, Naoki) [JP/JP]; 〒267-0056 千葉県千葉市緑区大野台1-2-3 日清紡績株式会社 研究開発センター内 Chiba (JP). 小田 竜一 (ODA, Ryuichi) [JP/JP]; 〒267-0056 千葉県千葉市緑区大野台1-2-3 日清紡績株式会社 研究開発センター内 Chiba (JP).

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願 2002-340464  
2002 年 11 月 25 日 (25.11.2002) JP

(74) 代理人: 川口 嘉之, 外 (KAWAGUCHI, Yoshiyuki et al.); 〒103-0004 東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 アクロポリス 21 ビル 6 階 Tokyo (JP).

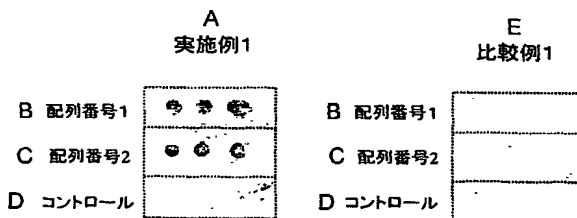
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 日清紡績株式会社 (NISSHINBO INDUSTRIES, INC.) [JP/JP];

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE,

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF FIXING BIOMOLECULE ON METAL SUPPORT

(54) 発明の名称: 生体分子の金属担体への固定法



(57) Abstract: A solution of a nucleic acid is spotted on a metal support comprising a metal selected from among the metals of the groups I, II, III, IV, V, VI and VII in the second to seventh periods in the periodic table and transition metals or an alloy containing such a metal, and dried. Then the support is irradiated with ultraviolet rays containing a component of a wavelength of 280 nm, preferably in a dose of 100 mJ/cm<sup>2</sup> or more, to thereby fix the nucleic acid on the support.

(57) 要約:

A... EXAMPLE 1  
B... SEQ ID NO:1  
C... SEQ ID NO:2  
D... CONTROL  
E... COMPARATIVE EXAMPLE 1

核酸の溶液を、周期律表第2周期～第7周期のI、II、III、IV、V、VI、VII族および遷移元素から選ばれる金属、又は同金属を含む合金等からなる金属担体上にスポットし、同溶液を乾燥させ、担体に波長280nmの成分を含む紫外線を好ましくは100mJ/cm<sup>2</sup>以上照射することにより、前記担体に核酸を固定する。

WO 2004/048973 A1



DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(48) この訂正版の公開日: 2004 年 11 月 11 日

(15) 訂正情報:

PCTガゼット セクションIIの No.46/2004 (2004 年 11 月 11 日)を参照

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。